

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06222

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A01H5/00, C12N15/11, C12N15/63, C12N15/82

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A01H5/00, C12N15/11, C12N15/63, C12N15/82

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG), JICST FILE (JOIS),  
DDBJ, GenBank, EMBL, GeneSeq, JPOna

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO, 89/10396, A1 (PLANT GENETIC SYSTEMS N.V.), 02 November, 1989 (02.11.89), Full text; all drawings & JP, 2-503988, A & US, 5652354, A	6, 8
A	WO, 92/13956, A1 (PLANT GENETIC SYSTEMS N.V.), 20 August, 1992 (20.08.92), Full text; all drawings & JP, 6-504910, A & US, 5639948, A	6, 8

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier document but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
05 December, 2000 (05.12.00)

Date of mailing of the international search report  
12 December, 2000 (12.12.00)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06222

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 1-5,7,9,10  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

The promoters to be employed are not sufficiently specified. In particular, it is completely unclear, based on the term "a fragment of the first promoter", as far as which part can act as a promoter and enables the construction of male sterile plant.

3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

PCT

## 国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)  
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 YCT-518	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。		
国際出願番号 PCT/JPO0/06222	国際出願日 (日.月.年) 12.09.00	優先日 (日.月.年) 30.09.99	
出願人(氏名又は名称) 日本たばこ産業株式会社			

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

## 1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☒ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☒ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 1 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☐ なし

☒ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

## 第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☒ 請求の範囲 1-5, 7, 9, 10 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、  
使用するプロモーターの特定が不十分である。特に「第一のプロモーターの断片」という記載では、どの部分までがプロモーターとしての機能を有し、雄性不稔植物を作出することができるのか、まったく不明瞭である。
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> A01H5/00, C12N15/11, C12N15/63, C12N15/82

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> A01H5/00, C12N15/11, C12N15/63, C12N15/82

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS (DIALOG), JICSTファイル (JOIS),  
DDBJ, GenBank, EMBL, GeneSeq, JPOna

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO, 89/10396, A1 (PLANT GENETIC SYSTEMS N.V.), 2. 11月. 1989 (02. 11. 89), 全文, 全図&JP, 2-503988, A&US, 5652354, A	6, 8
A	WO, 92/13956, A1 (PLANT GENETIC SYSTEMS N.V.), 20. 8月. 1992 (20. 08. 92); 全文, 全図&JP, 6-504910, A&US, 5639948, A	6, 8

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

05. 12. 00

国際調査報告の発送日

12.12.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

坂田 誠

2B

9318

電話番号 03-3581-1101 内線 3235

## PCT REQUEST

1/4

YCT-518

<b>0</b>	<b>For receiving Office use only</b>	
<b>0-1</b>	International Application No.	
<b>0-2</b>	International Filing Date	12.9.00
<b>0-3</b>	Name of receiving Office and "PCT International Application"	
<b>0-4</b>	<b>Form - PCT/RO/101 PCT Request</b>	
<b>0-4-1</b>	Prepared using	<b>PCT-EASY Version 2.91 (updated 01.07.2000)</b>
<b>0-5</b>	<b>Petition</b> The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty	
<b>0-6</b>	<b>Receiving Office (specified by the applicant)</b>	<b>Japanese Patent Office (RO/JP)</b>
<b>0-7</b>	<b>Applicant's or agent's file reference</b>	<b>YCT-518</b>
<b>I</b>	<b>Title of invention</b>	<b>METHOD FOR PRODUCING MALE-STERILE PLANT</b>
<b>II</b>	<b>Applicant</b>	
<b>II-1</b>	This person is:	<b>applicant only</b>
<b>II-2</b>	Applicant for	<b>all designated States except US</b>
<b>II-4</b>	Name	<b>JAPAN TOBACCO INC.</b>
<b>II-5</b>	Address:	<b>2-1, Toranomon 2-chome, Minato-ku, Tokyo 105-8422 Japan</b>
<b>II-6</b>	State of nationality	<b>JP</b>
<b>II-7</b>	State of residence	<b>JP</b>
<b>III-1</b>	<b>Applicant and/or inventor</b>	
<b>III-1-1</b>	This person is:	<b>applicant and inventor</b>
<b>III-1-2</b>	Applicant for	<b>US only</b>
<b>III-1-4</b>	Name (LAST, First)	<b>HAMADA, Kazuyuki</b>
<b>III-1-5</b>	Address:	<b>c/o Orynova K.K. 700, Higashibara, Toyoda-cho, Iwata-gun, Shizuoka 438-0802 Japan</b>
<b>III-1-6</b>	State of nationality	<b>JP</b>
<b>III-1-7</b>	State of residence	<b>JP</b>

## PCT REQUEST

YCT-518

<b>III-2</b>	<b>Applicant and/or inventor</b>	
III-2-1	This person is:	applicant and inventor
III-2-2	Applicant for	US only
III-2-4	Name (LAST, First)	NAKAKIDO, Fumio
III-2-5	Address:	c/o Orynova K.K. 700, Higashibara, Toyoda-cho, Iwata-gun, Shizuoka 438-0802 Japan
III-2-6	State of nationality	JP
III-2-7	State of residence	JP
<b>IV-1</b>	<b>Agent or common representative; or address for correspondence</b> The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:	agent
IV-1-1	Name (LAST, First)	SHAMOTO, Ichio
IV-1-2	Address:	YUASA AND HARA Section 206, New Ohtemachi Bldg, 2-1, Ohtemachi 2-chome, Chiyoda-ku, Tokyo 100-0004 Japan
IV-1-3	Telephone No.	03-3270-6641
IV-1-4	Facsimile No.	03-3246-0233
IV-1-5	e-mail	yulawpat@yuasa-hara.co.jp
<b>IV-2</b>	<b>Additional agent(s)</b>	additional agent(s) with same address as first named agent
IV-2-1	Name(s)	IMAI, Shosuke; MASUI, Chuji; KOBAYASHI, Yasushi; TOMITA, Hiroyuki; MURAKAMI, Kiyoshi
<b>V</b>	<b>Designation of States</b>	
<b>V-1</b>	Regional Patent (other kinds of protection or treatment, if any, are specified between parentheses after the designation(s) concerned)	EP: AT BE CH&LI CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT
<b>V-2</b>	National Patent (other kinds of protection or treatment, if any, are specified between parentheses after the designation(s) concerned)	AU CA CN KR US

## PCT REQUEST

YCT-518

<b>V-5</b>	<b>Precautionary Designation Statement</b> In addition to the designations made under items V-1, V-2 and V-3, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) of the State(s) indicated under item V-6 below. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit.		
<b>V-6</b>	<b>Exclusion(s) from precautionary designations</b>	<b>NONE</b>	
<b>VI-1</b>	<b>Priority claim of earlier national application</b>		
VI-1-1	Filing date	<b>30 September 1999 (30.09.1999)</b>	
VI-1-2	Number	<b>279307/1999</b>	
VI-1-3	Country	<b>JP</b>	
<b>VI-2</b>	<b>Priority document request</b> The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) identified above as item(s):	<b>VI-1</b>	
<b>VII-1</b>	<b>International Searching Authority Chosen</b>	<b>Japanese Patent Office (JPO) (ISA/JP)</b>	
<b>VIII</b>	<b>Check list</b>	number of sheets	electronic file(s) attached
VIII-1	Request	<b>4</b>	-
VIII-2	Description (excluding sequence listing part)	<b>9</b>	-
VIII-3	Claims	<b>1</b>	-
VIII-4	Abstract	<b>1</b>	-
VIII-5	Drawings	<b>1</b>	-
VIII-6	Sequence listing part of description	<b>13</b>	-
VIII-7	TOTAL	<b>29</b>	
	<b>Accompanying items</b>	paper document(s) attached	electronic file(s) attached
VIII-8	Fee calculation sheet	✓	-
VIII-15	Nucleotide and/or amino acid sequence listing in computer readable form		-
VIII-16	PCT-EASY diskette	-	<b>diskette</b>
<b>VIII-18</b>	<b>Figure of the drawings which should accompany the abstract</b>		
<b>VIII-19</b>	<b>Language of filing of the international application</b>	<b>Japanese</b>	
<b>IX-1</b>	<b>Signature of applicant or agent</b>		
IX-1-1	Name (LAST, First)	<b>SHAMOTO, Ichio (seal)</b>	
<b>IX-2</b>	<b>Signature of applicant or agent</b>		
IX-2-1	Name (LAST, First)	<b>IMAI, Shosuke (seal)</b>	



## PCT REQUEST

YCT-518

IX-3	Signature of applicant or agent	
IX-3-1	Name (LAST, First)	MASUI, Chuji (seal)
IX-4	Signature of applicant or agent	
IX-4-1	Name (LAST, First)	KOBAYASHI, Yasushi (seal)
IX-5	Signature of applicant or agent	
IX-5-1	Name (LAST, First)	TOMITA, Hiroyuki (seal)
IX-6	Signature of applicant or agent	
IX-6-1	Name (LAST, First)	MURAKAMI, Kiyoshi (seal)

## FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

10-1	Date of actual receipt of the purported international application	
10-2	Drawings:	
10-2-1	Received	
10-2-2	Not received	
10-3	Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application	
10-4	Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2)	
10-5	International Searching Authority	ISA/JP
10-6	Transmittal of search copy delayed until search fee is paid	

## FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

11-1	Date of receipt of the record copy by the International Bureau	
------	----------------------------------------------------------------	--



(43) 國際公開日  
2001 年 4 月 12 日 (12.04.2001)

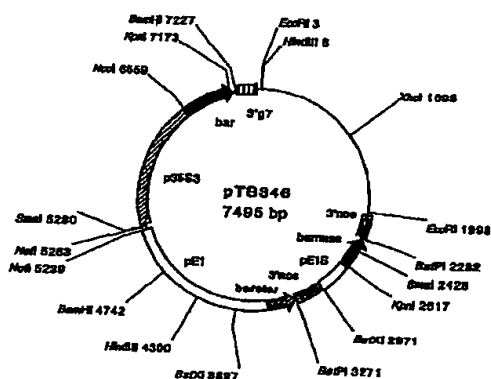
**PCT**

(10) 国際公開番号  
**WO 01/24616 A1**

- |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>(51) 国際特許分類<sup>7)</sup>: A01H 5/00, C12N 15/11, 15/63, 15/82</p> <p>(21) 国際出願番号: PCT/JP00/06222</p> <p>(22) 国際出願日: 2000年9月12日 (12.09.2000)</p> <p>(25) 国際出願の言語: 日本語</p> <p>(26) 国際公開の言語: 日本語</p> <p>(30) 優先権データ:<br/>特願平11/279307 1999年9月30日 (30.09.1999) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 日本たばこ産業株式会社 (JAPAN TOBACCO INC.) [JP/JP]; 〒105-8422 東京都港区虎ノ門2丁目2番1号 Tokyo (JP).</p> <p>(72) 発明者; および</p> <p>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 浜田和</p> | <p>行 (HAMADA, Kazuyuki) [JP/JP]. 中木戸文夫 (NAKAKIDO, Fumio) [JP/JP]; 〒438-0802 静岡県磐田郡豊田町東原700番地 株式会社 オリノバ内 Shizuoka (JP).</p> <p>(74) 代理人: 社本一夫, 外 (SHAMOTO, Ichio et al.); 〒100-0004 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo (JP).</p> <p>(81) 指定国 (国内): AU, CA, CN, KR, US.</p> <p>(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類:<br/>— 国際調査報告書</p> <p>2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。</p> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

**(54) Title: METHOD OF CONSTRUCTING MALE STERILE PLANT**

(54) 発明の名称: 雄性不稔植物の作出方法



**(57) Abstract:** A method of constructing a male sterile plant which shows a normal morphology similar to the original species but being male sterile. More particularly speaking, a method of constructing a male sterile plant which comprises ligating a promoter fragment to the upstream of an RNase gene, ligating a promoter different from the above-described promoter to the upstream of an RNase inhibitory protein gene and then transferring into a plant genome to thereby make the plant substantially male sterile.

**(57) 要約:**

本発明は、雄性不稔性であることを除き原品種と同様な正常な形態を示す雄性不稔植物を作出する方法を提供するものである。具体的には、RNA分解酵素遺伝子の上流にプロモーターの断片を結合し、RNA分解酵素阻害蛋白遺伝子の上流に前記プロモーターと同一又は異なるプロモーターを結合し、植物ゲノム中に導入することにより、当該植物を実質的に雄性不稔化することを特徴とする雄性不稔植物の作出方法を提供する。

**WO 01/24616 A1**

## 明細書

## 雄性不稔植物の作出方法

## 5. 関連出願

本発明は、1999年9月30日に出願された日本国出願（特願平11-279307号）に基づく優先権の主張を伴い、その内容は本明細書に援用される。

## 発明の属する技術分野

10 本発明は、遺伝子操作により、雄性不稔植物を作出する方法に関する。

## 従来の技術

バルナーゼ(barnase) はバチルス・アミロリクイフェシエンス(*Bacillus amylolyquifaciens*)由来のRNA 分解酵素(RNase) である(N. Nishimura and M. Nomura, *Biochem. Biophys. Acta* 30, 430-431:1958; R.W. Hartley, *J. Mol. Biol.*, 15 202, 913-915:1988)。本酵素はアミノ酸残基110 個を有し、RNA を加水分解する酵素である。本酵素が細胞内で発現すると、その強力なRNA 分解活性により細胞機能が阻害され、多くの場合細胞は死滅する。その性質を利用して、バルナーゼの遺伝子を植物の所定の部位に発現させることができれば、当該部位の機能を20 選択的に抑制することができる。

PCT 出願国際公開第8910396 号には、上記のバルナーゼ遺伝子を薬組織のタペータム細胞に特異的な発現プロモーターの下流に結合して作成した雄性不稔遺伝子を植物に導入し、雄性不稔植物を得る技術が報告されている。このような雄性不稔化技術は効率の良いF1ハイブリッド品種の開発において非常に有用である。

25 しかし、バルナーゼ遺伝子を雄性不稔遺伝子として使用した場合には、雄性不稔形質転換体が、好ましくない形質を示す場合がしばしば観察されている。PCT 出願国際公開第9626283 号にはイネにおけるこのような問題が述べられているが、イネだけでなくレタスにおいても同様な現象が報告されている(*Scientia Horticulturae* 55, 125-139:1993; Arlette Reymaerts, Hilde Van de Wiele, Greta

De Sutter, Jan Janssens: Engineered genes for fertility control and the  
ir application in hybrid seed production)。その報告によるとタバコ由来の  
薬特異的プロモーター(TA29)とバルナーゼを用いた雄性不稔遺伝子をレタスに導  
入した場合、活力の低下した植物体が現れる。

- 5      このような現象の正確な原因は解明されていないが、たとえば、いわゆる遺伝  
子導入部位の「位置効果」の影響がそのメカニズムとして想定されている(PCT出  
願国際公開第9626283 号)。より具体的には、雄性不稔遺伝子が目的とする部位  
である薬でのみ発現すれば希望する雄性不稔植物が作成できるが、当該遺伝子の  
導入部位近傍に存在する内在性のエンハンサー等の発現調節因子の影響で薬組織  
10    以外でもバルナーゼがごく微量発現する可能性がある。このような場合、酵素活  
性が強力であるために、上述した好ましくない形質の現れることが考えられる。

- この問題を克服するために、PCT 出願国際公開第9626283 号にはまた、カリフ  
ラワーモザイクウイルス35S プロモーター（以下、CaMV35S プロモーターという  
）の、薬以外での組織で強力に発現するという性質を利用した次のような方法が  
15    記載されている。すなわち、バルナーゼに対する阻害タンパク質であるバースタ  
ー(Barstar)を使用する方法であり、CaMV35S プロモーターに結合したバースタ  
ー遺伝子を植物に同時に導入して薬以外の組織でバースター遺伝子を構成的に発  
現させることにより、薬以外におけるバルナーゼの影響を排除するというもので  
ある。

- 20    しかしながら、この方法で作出した雄性不稔植物では、葉や可食部である胚乳  
を含む全身でバースター遺伝子が発現することになる。本来不必要な部位におけ  
るバースタータンパク質の発現は、遺伝子組換え作物のパブリックアクセプタンス  
(public acceptance) の観点からも決して望ましいものではない。

## 25    発明の概要

    本発明は雄性不稔性であることを除いて原品種と同様な正常な形態を示す雄性  
不稔植物を作出する方法を提供する。

    本発明は、植物の薬において外来のRNA 分解酵素 (RNase)を発現させて、雄性  
不稔植物を作出する方法において、外来のRNaseが薬以外の組織で発現すること

を極力抑えて、原品種と同様な正常な形態を示す雄性不稔植物を作出する方法を提供する。

#### 図面の簡単な説明

- 5      図1は、薬特異的E1プロモーターのコントロール下のバースター遺伝子および薬特異的E1プロモーター断片のコントロール下のバルナーゼ遺伝子を5' から3' 方向に向けてこの順に含む、植物細胞形質転換用プラスミドpTS346の構造を模式的に示す図である。

#### 10      発明の詳細な説明

- 本発明者らは、イネ由来の薬特異的E1プロモーターにバルナーゼ遺伝子を結合したコンストラクトを導入したイネ雄性不稔系統において、形態異常に改善のみ  
15      られた2つの雄性不稔系統を得た。これらの系統を解析したところ、イネ形質転換に使用した*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 由来の約10 kb のトランスポゾンによりE1プロモーターが2つに分断されていた。このことから、トランスポゾンにより10kb以上も引き離されることにより、E1プロモーターの上位部がバルナーゼ遺伝子の発現に及ぼす影響が排除され、その結果としてバルナーゼ遺伝子の発現が低減し、形態異常が改善されたと考えることができる。

- 上記の知見は、全長より短い薬特異的プロモーター（プロモーター断片）の下  
20      流にバルナーゼ遺伝子等のRNase遺伝子を結合して植物ゲノムに導入すれば、従来問題となっていた薬以外の組織におけるRNaseの発現が抑制されることを意味している。そこで、本発明者らはさらに研究を押し進め、薬特異的プロモーター断片と結合したRNase遺伝子に加えて、バースター遺伝子をイネ薬特異的E1プロモーターの下流に結合したものも、同時導入することにより形質転換イネを作成  
25      し、さらなる形態の改善を達成した。

したがって、本発明は、RNase遺伝子上流に第一のプロモーターの断片を結合し、さらに、RNase阻害蛋白遺伝子上流に同一又は異なる第二のプロモーターを結合し、これらを植物ゲノム中に導入することにより、当該植物を実質的に雄性不稔化することを特徴とする、雄性不稔植物の作出方法である。

本発明で使用するRNase遺伝子は、好ましくはバルナーゼ遺伝子である。バルナーゼ遺伝子は、そのまま使用してもよく、あるいは天然または人為的に変異してコードされる酵素の活性や組織特異性が修飾されていてもよい。また、植物細胞、特に薬中でRNaseとして作用し、細胞中でのタンパク質の生合成を阻害する酵素の遺伝子は、いずれも本発明の目的に使用可能である。それらの例は、膵臓由来のRNase A、*Aspergillus oryzae*由来のRNase T1、*Streptomyces aureofaciens*由来のSarnase (EP 公開特許053799号公報)等である。

RNase遺伝子上流に結合するプロモーター（第一のプロモーター）は、植物細胞中で、使用する特定のRNase遺伝子の発現を誘導する任意のプロモーターである。それらの例は、タバコのTA29プロモーター(J. Seurinck et al., Nuc. Ac. id. Res., 18, 3403, 1990)、アラビドプシスのA9プロモーター(Wyatt Paul et al., Plant Mol. Biol., 19, 611-622, 1992)などである。好ましくは、第一のプロモーターは雄性不稔性にすべき植物の薬に特異的なプロモーターであり、イネについては薬特異的なプロモーターとして、E1プロモーター、T72プロモーター、T42プロモーター（いずれもW09213956号公報記載）、Osg6Bプロモーター、Osg4Bプロモーター（いずれもT. Tsuchiya et al., Plant Mol. Biol. 26, 1737-1746, 1994）等が知られている。E1プロモーターの配列は配列番号6に示されている。

第一のプロモーターは断片として使用することが重要である。本明細書中で、第一のプロモーターに関して断片というときは、天然に存在するプロモーターの配列と少なくとも一部が相違することを意味し、例えば、介在配列により前後に分断されている場合も含めて、3'領域、内部領域、および／または5'領域に欠失、置換または挿入が存在するプロモーターである。このような欠失、置換、挿入の結果、本来のプロモーター配列と50%程度まで相同性を有する断片が好ましく、さらに好ましくは70%程度まで相同性を有する断片が好ましく、特に好ましくは90%程度まで相同性を有する断片が好ましい。第一のプロモーターの断片として好ましい具体例の一つは、E1プロモーター由来の、配列番号7に示す断片である。この配列中の塩基の1ないし複数個が置換、欠失または挿入により修飾された配列も、配列番号7に示す断片と同様のプロモーター活性を有するかぎり、第一のプロモーターの断片として好ましい。ここで、複数個の塩基の置換、欠

失または挿入による修飾とは、例えば部位特異的変異誘発法などの人為操作でできる程度の修飾を意味し、例えば10以下、好ましくは5以下の修飾を意味する。

5 第一のプロモーターの断片は、RNase遺伝子上流に機能可能に結合して使用する。機能可能とは、プロモーター要素がRNase遺伝子の発現を誘発することができる位置関係を意味する。

本発明においては、RNase阻害蛋白質遺伝子を使用することも重要である。これは使用するRNase遺伝子に応じて適宜選択され、例えばRNase遺伝子がバルナーゼ遺伝子である場合に、好ましいRNase阻害蛋白質遺伝子はバースター遺伝子である。RNase阻害蛋白質遺伝子上流には、第二のプロモーターを機能可能に結合する。第二のプロモーターは植物細胞中で、使用するRNase阻害蛋白質遺伝子の発現を誘発するものであり、第一のプロモーターと同じであっても異なってもよい。但し、第一のプロモーターと同じものを用いる場合、必ずしも断片として使用することは要しない。

15 第一のプロモーターの断片と機能可能に結合したRNase遺伝子は、第二のプロモーターと機能可能に結合したRNase阻害蛋白質遺伝子の下流に配置しても上流に配置してもよい。両者の間隔についても特別の制限はない。

本発明の方法により雄性不稔化することができる植物は特に限定されないが、例えば、イネ、トウモロコシ、タバコ、レタス、ナタネ等を挙げることができる。

20 本発明において植物を雄性不稔化するために、植物細胞のゲノムに遺伝子を導入するための方法は、アグロバクテリウム法、エレクトロポレーション法、パーティクルガン法などがある。好ましい方法はアグロバクテリウム法である。その具体的方法は、例えばPCT国際公開W092/13957に記載の方法を参照して、当業者が適宜決定してよい。一例を示せば、次の工程により植物細胞のゲノムに遺伝子を導入することができる：

- (1) 第一のプロモーターの断片を用意し、
- (2) RNase遺伝子を用意し、
- (3) 第一のプロモーター断片の下流にRNase遺伝子を機能可能に結合し、

- (4) 第二のプロモーターを用意し、  
(5) RNase阻害蛋白質遺伝子を用意し、  
(6) 第二のプロモーターの下流にRNase阻害蛋白質遺伝子を機能可能に結合し、  
(7) 第一のプロモーター断片の下流に結合したRNase遺伝子および第二のプロ  
5 モーターの下流に結合したRNase阻害蛋白質遺伝子を、制限酵素部位を利用してT  
-DNAに組み込み、  
(8) 工程(7) のT-DNAを、Tiプラスミド中に存在させ、  
(9) 必要であれば、工程(8) のTiプラスミドをアグロバクテリウム細菌中で増  
幅し、  
10 (10)工程(9) のアグロバクテリウム細菌を、植物細胞に感染させて、第一のプロ  
モーター断片の下流に結合したRNase遺伝子および第二のプロモーターの下流  
に結合したRNase阻害蛋白質遺伝子を、該植物細胞のゲノムに導入する。

形質転換した植物細胞は、カルス培養から出発して完全な植物体に再生するこ  
とができる。その方法は、例えばY. Hiei et al., Plant J. 6, 271-282: 1994  
15 に記載されている。

上記工程において、第一のプロモーターの断片の調製は、第一のプロモーター  
を適当な制限酵素で切断することにより行ってもよく、あるいは、後記実施例に  
示すように、第一のプロモーターとRNase遺伝子を含むプラスミドから、PCRによ  
り、プライマーを適宜選択して不要な領域を除いた配列のみを増幅させてもよい  
20 。また、上記工程、特に(1)～(7)の順序や、材料を適宜変更することは本発明  
の範囲内である。また、第一のプロモーター断片の下流に結合したRNase遺伝子  
と第二のプロモーターの下流に結合したRNase阻害蛋白質遺伝子を、別々に組み  
込んだT-DNAを含む、別々のTiプラスミドを用いて、植物細胞の形質転換を行う  
こともできる。さらに、上記工程(7)のT-DNAに予め選抜マーカールを含めておけ  
25 ば、目的の遺伝子が導入されたカルスの選抜を容易にすることができる。そのよ  
うなマーカールの例として、後述の実施例で用いるBar遺伝子、あるいはハイグロ  
マイシン耐性(HPT)遺伝子が挙げられる。しかし、選抜マーカールの使用は必須で  
はなく、形質転換植物細胞から生じたカルスから再生した植物が雄性不稔化され  
ていることを、形質転換が達成されたことの指標としてもよい。



本発明は、上記アグロバクテリウム法により、植物細胞のゲノムに目的の遺伝子を導入するためのベクターも提供する。該ベクターは、i)プロモーターの断片とそれにより発現誘導されるRNA分解酵素遺伝子、およびii)前記プロモーターと同一又は異なるプロモーターとそれにより発現誘導されるRNA分解酵素阻害蛋白遺伝子、を含むT-DNAを有し、植物細胞に感染したアグロバクテリウム細菌中に存在するとき該植物細胞のゲノムに前記T-DNAを導入することができるベクターである。好ましくは、本発明のベクターは、植物形質転換用のTiプラスミドに、上記i)およびii)の遺伝子要素を含むT-DNAを組み込んでなるものである。植物形質転換用のTiプラスミドは、種々のものが知られまた入手可能であるが、例えば、LBA4404株の持つpAL4404が挙げられる。本発明のベクターは、必要に応じて、アグロバクテリウム細菌中で増幅するための複製開始点、RNA分解酵素遺伝子およびRNA分解酵素阻害蛋白遺伝子の各下流のターミネーター、および/または形質転換された植物細胞の選抜のために適するマーカー遺伝子の一つ以上を含んでもよい。

本発明はさらに、i)プロモーターの断片とそれにより発現誘導されるRNA分解酵素遺伝子、およびii)前記プロモーターと同一又は異なるプロモーターとそれにより発現誘導されるRNA分解酵素阻害蛋白遺伝子を、本発明の方法でゲノムに導入されて含む形質転換植物細胞、および該細胞から再生された雄性不稔植物も提供する。

20

#### 発明の効果

上流部の欠失により活性の低減されたプロモーターにバルナーゼ遺伝子を結合し、さらにイネ特異的プロモーターに結合されたバースター遺伝子を同時導入することにより、従来のコンストラクトでみられた形態や開花特性の異常の少ない雄性不稔植物の作出が可能になった。

25

以下、実施例に基づいて、本発明を詳細に説明するが、本発明は実施例のみに限定されるものではない。

#### 実施例

E1プロモーターの断片の下流に結合したバルナーゼ遺伝子を増幅させるための  
鋳型としてプラスミドpTS172（特願平10-220060）を使用した。プライマーとし  
て内部にPstI切断部位を持つ172del-F（配列番号 1）と172del-R（配列番号 2）  
を用いて、PCR 法により増幅を行なった後、制限酵素PstIで処理した。その結果  
5、両端にPstIの粘着末端を持ち、かつpTS172のE1プロモーターのうち翻訳開始点  
の上流約360bp を残してそれ以外を欠いた断片が得られた。この断片の両端を常  
法によりT4 DNAライゲースにより結合することで再び環状化し、新規のプラスミ  
ドpTS172Δ（配列番号 3）とした。すなわち、pTS172Δは、基になったプラスミ  
ドpTS172のE1プロモーター部分（約1.7kb）が、配列番号 7 の365bpの断片に変わっ  
10 たものであるということが出来る。

pTS172ΔのPstI部位にE1プロモーター（PCT出願国際公開第9213956 号）とバー  
スター遺伝子（R. W. Hartley J. Mol. Biol. 202, 913-915 : 1988）を結合した断片  
（配列番号 4）を平滑化して組み込み、これをpTS346（配列番号 5）とした。pT  
S346の構造を、図 1 に模式的に示す。

15 pTS346から制限酵素EcoRI により、5.5 kbの断片を切り出し、pSB11BS（構造  
はすぐ後に説明する）のEcoRI 部位に挿入し、更に相同組換えによりそのT-DNA  
領域をacceptor vector pSB1（T. Komari et al., Plant J. 10, 165-174:1996）に  
組み込んだ。この組換え型プラスミド（pSB1346）を持つAgrobacterium tumefaci  
ens LBA4404 をイネ（品種朝の光）の形質転換に用いた。pSB11BS は中間ベクタ  
20 -pSB11（T. Komari Plant J. 10, 165-174:1996）のStuI部位にバースター遺伝子  
（R. W. Hartley J. Mol. Biol. 202, 913-915 : 1988）を組み込んだものである。

この組換え型プラスミドをもつAgrobacterium tumefaciens LBA4404 をイネ（  
品種アサノヒカリ）に形質転換した。形質転換の方法は、基本的にHieiらの方法  
（Hiei et al., Plant J. 6, 271-282:1994）に従ったが、構築した雄性不稔遺伝  
25 子が選抜マーカーとしてbar 遺伝子（phosphinothricin acetyl transferase を  
コードする）を含んでいるので、遺伝子が導入されたカルスを選抜するためにph  
osphinothricin（濃度10 mg/L）を用いた。

通常の長さのE1プロモーターを利用し、かつバースター遺伝子は使用していな  
いコンストラクトpSB1172（1999年8月3日出願の、PCT/JP99/04167明細書参照）

を導入した場合と比較すると、形質転換の効率、形態の正常な形質転換体の割合は表のように顕著に改善された。

表 1 : 形質転換効率

5

10

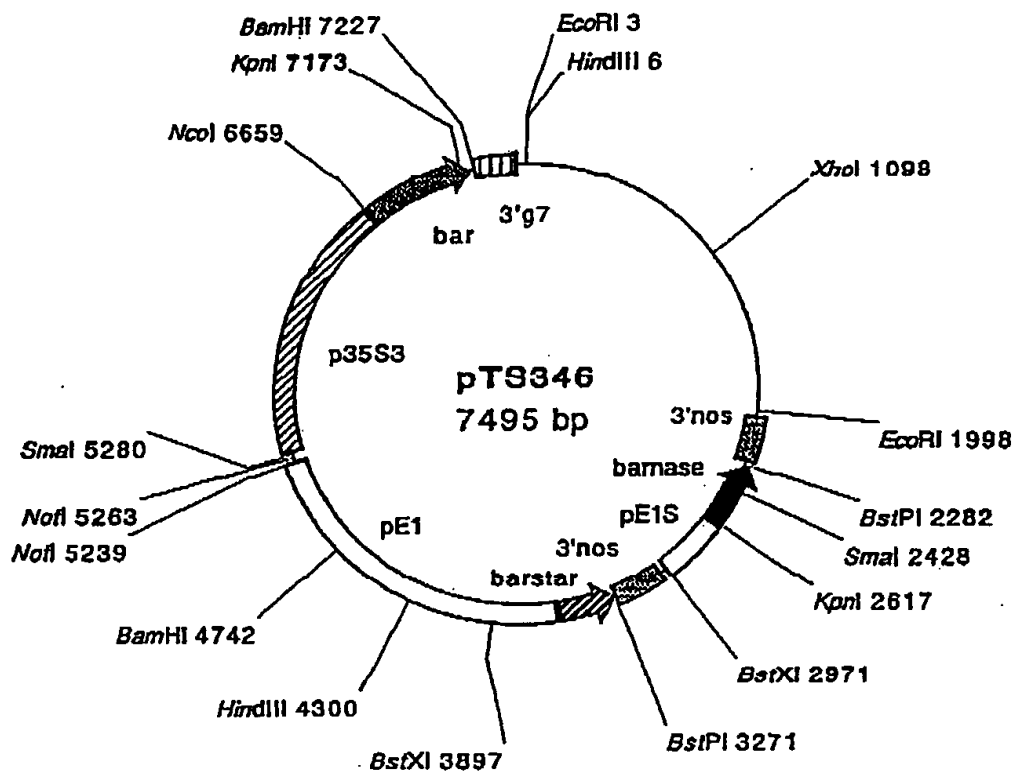
	感染カルス数	再分化 カルス数	PCR 陽性 系統数	形態の正常な 雄性不稔系統数
pSB1346	681	45	37/38*	15/37 40.5%
pSB1172(対照)	2838	83	52/83	9/52 17.3%

\*:45 系統のうち38系統を調査

## 請求の範囲

1. RNA分解酵素遺伝子上流に第一のプロモーターの断片を結合し、RNA分解酵素阻害蛋白遺伝子上流に前記プロモーターと同一又は異なる第二のプロモーターを結合し、植物ゲノム中に導入することにより、当該植物を実質的に雄性不稔化することを特徴とする雄性不稔植物の作出方法。
2. RNA分解酵素遺伝子がバルナーゼ遺伝子であることを特徴とする請求項1記載の雄性不稔植物の作出方法。
3. RNA分解酵素阻害蛋白遺伝子がバースター遺伝子であることを特徴とする請求項1又は2記載の雄性不稔植物の作出方法。
4. 第一および第二のプロモーターが共に薬特異的な発現をもたらすプロモーターであることを特徴とする請求項1乃至3記載の雄性不稔植物の作出方法。
5. 第一のプロモーターが配列番号6記載のプロモーターの一部であることを特徴とする請求項1乃至4記載の雄性不稔植物の作出方法。
6. 第一のプロモーターが配列番号7記載のプロモーターであることを特徴とする請求項1乃至5記載の雄性不稔植物の作出方法。
7. 配列番号6記載の配列の一部からなるプロモーター。
8. 配列番号7記載の配列またはその塩基の1ないし複数個が置換、欠失または挿入により修飾された配列からなるプロモーター。
9. i) 第一のプロモーターの断片とそれにより発現誘導されるRNA分解酵素遺伝子、およびii) 前記プロモーターと同一又は異なる第二のプロモーターとそれにより発現誘導されるRNA分解酵素阻害蛋白遺伝子、を含むT-DNAを有し、植物細胞に感染したアグロバクテリウム細菌中に存在するとき該植物細胞のゲノムに前記T-DNAを導入することができるプラスミドベクター。
10. i) 第一のプロモーターの断片とそれにより発現誘導されるRNA分解酵素遺伝子、およびii) 前記プロモーターと同一又は異なる第二のプロモーターとそれにより発現誘導されるRNA分解酵素阻害蛋白遺伝子を、ゲノムに導入されて含む形質転換植物細胞、および該細胞から再生された雄性不稔植物。

図 1



## SEQUENCE LISTING

<110> Japan Tobacco Inc.

<120> Method for producing male-sterile plant

<130> YCT-518

<160> 7

<210> 1

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer 172del-F

<400> 1

ggctgcagtg cggccgctag cctaggcccg ggcccacaaa aatctg

46

<210> 2

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer 172del-R

<400> 2

gggctgcagt cagccagcca gaccaatggg ggcaaaattt ac

42

<210> 3

<211> 5228

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Plasmid pTS172Δ

<400> 3

aattcaagct tgacgtcagg tggcactttt cggggaaatg tgcgcggaac ccctatttgt 60  
ttattttttct aaatacattc aaatatgtat ccgtcatga gacaataacc ctgataaatg 120  
cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac atttccgtgt cgcccttatt 180  
cccttttttg cggcattttg ccttctgtt tttgctcacc cagaaacgct ggtgaaagta 240  
aaagatgctg aagatcagtt ggggtgcacga gtgggttaca tcgaactgga tctcaacagc 300  
ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc caatgatgag cacttttaaa 360  
gttctgctat gtggcgcggt attatcccgt attgacgccg ggcaagagca actcggtcgc 420  
cgcatacact attctcagaa tgacttggtt gagtactcac cagtcacaga aaagcatctt 480  
acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca taaccatgag tgataacact 540  
gcggccaact tactttctgac aacgatcgga ggaccgaagg agctaaccgc ttttttgac 600  
aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaac cggagctgaa tgaagccata 660  
ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg caacaacgtt gcgcaaacta 720  
ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat taatagactg gatggaggcg 780  
gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttcggt ctggctgggt tattgctgat 840

aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg cagcactggg gccagatggt 900  
aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc aggcaactat ggatgaacga 960  
aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc attggtaact gtcagaccaa 1020  
gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt ttttaatttaa aaggatctag 1080  
gtgaagatcc tttttggctc gagtctcatg accaaaatcc cttaacgtga gttttcgttc 1140  
cactgagcgt cagaccccgt agaaaagatc aaaggatctt ctigagatcc ttttttctg 1200  
cgcgtaatct gctgcttgca aacaaaaaaaa ccaccgctac cagcggtggt ttgtttgccg 1260  
gatcaagagc taccaactct tttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca 1320  
aatactgtcc ttctagtgtg gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg 1380  
cctacatacc tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg 1440  
tgtcttaccg ggttggactc aagacgatag ttaccggata aggcgacgagc gtcgggctga 1500  
acgggggggtt cgtgcacaca gccagcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac 1560  
ctacagcgtg agcatigaga aagcgccacg cttcccgaag ggagaaaggc ggacagggtat 1620  
ccgtaagcg gcagggtcgg aacaggagag cgacagaggg agcttccagg gggaaacgcc 1680  
tggtatcttt atagtccgtg cgggtttcgc caccctgac ttgagcgtcg atttttgtga 1740  
tgctcgtcag gggggcggag cctatggaaa aacgccagca acgcgccctt tttacggttc 1800  
ctggcccttt gctggccttt tgctcacatg ttctttctg cgttatcccc tgattctgtg 1860  
gataaccgta ttaccgcctt tgagttagct gataccgctc gccgcagccg aacgaccgag 1920  
cgacgcgagt cagttagcga ggaagcggaa gagcgcccaa tacgcaaacc gcctctcccc 1980  
gcgcgttggc ctgatcagaa ttcatatgca cgtgttcccg atctagtaac atagatgaca 2040  
ccgcgcgcga taatttatcc tagtttgcgc gctatatattt gttttctatc gcgtattaaa 2100  
tgtataattg cgggactcta atcataaaaa cccatctcat aaataacgtc atgcattaca 2160  
tgtaattat tacatgctta acgtaattca acagaaatta tatgataatc atcgcaagac 2220  
cggcaacagg attcaatctt aagaaacttt attgccaaat gtttgaacga tctgcttcgg 2280  
aggttacctt atctgatttt tgtaaaggtc tgataatggt ccgttgtttt gtaaatacgc 2340  
cagtcgcttg agtaaagaat ccggtctgaa tttctgaagc ctgatgtata gttaatatcc 2400  
gcttcacgcc atgttcgtcc gcttttgcgc gggagtttgc cttccctgtt tgagaagatg 2460  
tctccgccga tgcttttccc cggagcgacg tctgcaaggt tcccttttga tgccaccag 2520  
ccgagggtt gtgcttctga ttttgtaatg taattatcag gtagcttatg atatgtctga 2580



agataatccg caaccccgct aaacgtgttg ataaccggtg ccatcgcgac ggcttgatgg 2640  
atctcttgct ggacaccggg atgctaggat gggttatcgt ggccggcgtg cgtgtgtggc 2700  
ttttgtaggc gccggcgacg gcgggggcaa tgtggcaggt gagtcacggt gcaagcgtgc 2760  
gcaagtgact gcaacaacca aggacggtca tggcgaaagc acctcacgcg tccaccgtct 2820  
acaggatgta gcagtagcac ggtgaaagaa gtgtgtgtccc gtccattagg tgcattctca 2880  
ccgttggcca gaacaggacc gttcaacagt taggttgagt gtaggacttt tacgtgggta 2940  
atgtatggca aatagtagta aattttgccc ccatttgtct ggctgactgc aggcgccgcg 3000  
tagcctaggc ccggggccac aaaaatctga gcttaacagc acagttgctc ctctcagagc 3060  
agaatcgggt attcaacacc ctcatatcaa ctactacgtt gtgtataacg gtccacatgc 3120  
cggatatatac gatgactggg gttgtacaaa ggcggcaaca aacggcgctc ccggagttgc 3180  
acacaagaaa tttgccacta ttacagaggc aagagcagca gctgacgcgt acacaacaag 3240  
tcagcaaaca gacaggttga acttcatccc caaaggagaa gctcaactca agcccaagag 3300  
ctttgctaag gccctaaca gcccaccaa gcaaaaagcc cactggctca cgctaggaac 3360  
caaaaggccc agcagtgatc cagcccaaaa agagatctcc tttgccccgg agattacaat 3420  
ggacgatttc ctctatcttt acgatctagg aagggaagttc gaaggtgaag gtgacgacac 3480  
tatgttcacc actgataatg agaaggttag cctcttcaat ttcagaaaga atgctgaccc 3540  
acagatgggt agagaggcct acgcagcagg tctcatcaag acgatctacc cgagtaacaa 3600  
tctccaggag atcaaatacc ttccaagaa ggttaaagat gcagtcaaaa gattcaggac 3660  
taattgcac aagaacacag agaaagacat atttctcaag atcagaagta ctattccagt 3720  
atggacgatt caaggcttgc ttcataaacc aaggcaagta atagagattg gagtctctaa 3780  
aaaggtagtt cctactgaat ctaaggccat gcatggagtc taagattcaa atcgaggatc 3840  
taacagaact cgccgtgaag actggcgaac agttcataca gagtctttta cgactcaatg 3900  
acaagaagaa aatcttcgct aacatggtgg agcacgacac tctggtctac tccaaaaatg 3960  
tcaaagatac agtctcagaa gaccaaaggg ctattgagac ttttcaacaa aggataatgt 4020  
cgggaaacct cctcggattc cattgcccag ctatctgtca cttcatcgaa aggacagtag 4080  
aaaaggaagg tggtcctac aaatgccatc attgcgataa aggaaaggct atcattcaag 4140  
atgcctctgc cgacagtggg cccaaagatg gacccccacc cacgaggagc atcgtggaaa 4200  
aagaagacgt tccaaccacg tcttcaaagc aagtggattg atgtgacatc tccactgacg 4260  
taagggatga cgcacaatcc cactatcctt cgcaagaccc ttcctctata taaggaagtt 4320

catttcattt ggagaggaca cgctgaaatc accagtctct ctctataaat ctatctctct 4380  
ctctataacc atggacccag aacgacgccc ggccgacatc cgccgtgccca ccgaggcgga 4440  
catgccggcg gtctgcacca tcgtcaacca ctacatcgag acaagcacgg tcaacttcg 4500  
taccgagccg caggaaccgc aggagtggac ggacgacctc gtccgtctgc gggagcgcta 4560  
tccttggtc gtcgccgagg tggacggcga ggtcgccggc atcgctacg cgggcccctg 4620  
gaaggcacgc aacgcctacg actggacggc cgagtcgacc gtgtacgtct ccccccgcga 4680  
ccagcggacg ggactgggct ccacgtctta caccacctg ctgaagtccc tggaggcaca 4740  
gggcttcaag agcgtggtcg ctgtcatcgg gctgcccac gacccgagcg tgcgatgca 4800  
cgaggcgctc ggatatgccc cccgcggcat gctgcgggcg gccggcttca agcacgggaa 4860  
ctggcatgac gtgggtttct ggcagctgga cttcagcctg ccggtaccgc cccgtccggt 4920  
cctgcccgtc accgagatct gagatcacgc gttctaggat ccccgatga gctaagctag 4980  
ctatatcatc aatttatgta ttacacataa tatcgcactc agtctttcat ctacggcaat 5040  
gtaccagctg atataatcag ttattgaaat atttctgaat ttaaacttgc atcaataaat 5100  
ttatgttttt gcttggacta taatacctga cttgttattt tatcaataaa tatttaaact 5160  
atatcttttt caagatggga attaacatct acaaatggcc tttctttatc gaccatgtac 5220  
gtatcgcg 5228

<210> 4

<211> 2275

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> E1-barstar-3' nos

<400> 4

gaattcatat gcacgtgttc ccgatctagt aacatagatg acaccgcgcg cgataattta 60  
tcctagtttg cgcgctatat tttgttttct atcgcgatatt aaatgtataa ttgcgggact 120

ctaatcataa aaacccatct cataaataac gtcatgcatt acatgttaat tattacatgc 180  
 ttaacgtaat tcaacagaaa ttatatgata atcatcgcaa gaccggcaac aggattcaat 240  
 cttagaagaaac ttatttgcca aatgtttgaa cgatctgctt cggaggttac cttagaagaa 300  
 tatgatgggtg atgtcgcagc cttccgcttt cgcttcacgg aaaacctgaa gcacactctc 360  
 ggccgccattt tcagtcagct gcttgctttg ttcaaactgc ctccattcca aaacgagcgg 420  
 gtactccacc catccggtca gacaatccca taaagcgtcc aggttttcac cgtagtattc 480  
 cggaagggca agctcctttt tcaatgtctg gtggaggteg ctgatacttc tgatttgttc 540  
 cccgttaatg actgcttttt tcatcgcgac ggcttgatgg atctcttgct ggacaccggg 600  
 atgctaggat gggttatcgt ggccggcgtg cgtgtgtggc tttttaggc gccggcgacg 660  
 gcggggggcaa tgtggcaggt gagtcacggt gcaagcgtgc gcaagtgact gcaacaacca 720  
 aggacggtca tggcgaaagc acctcacgcg tccaccgtct acaggatgta gcagtagcac 780  
 ggtgaaagaa gtgttgtccc gtccattagg tgcattctca ccgttggcca gaacaggacc 840  
 gttcaacagt taggttgagt gtaggacttt tacgtggta atgtatggca aatagtagta 900  
 aattttgccc ccatttggtct ggctgagata gaacatattc tggaaagcct ctagcatatc 960  
 ttttttgaca gctaaacttt gcttcttgcc ttcttggctt agcaatgacg ttgcccatgt 1020  
 cgtggcaaac atcttgtaag gtaactgtat tcgtttgttc cttcaacgg ctcaatcccc 1080  
 acaggccaag ctatcctttc cttagcgata taggtctcct gagagattat actaccattt 1140  
 ttaagtgtt ataaagacga tgctctctaa ccagatcgat cagaaacaca aagttttagc 1200  
 agcgtaatat cccacacaca tacacacacg aagctatgcc tctcatttt ccgagagatt 1260  
 ctgacagtga ccagaatgtc agaatgcat ttcatgggca caagtgcac cacaagcttc 1320  
 ttggtggagg tcaagggtg ctattattat tcgctttcta ggaaattatt cagaattagt 1380  
 gccttttatc ataacttctc tctgagccga tgtggtttg gatttcattg ttgggagcta 1440  
 tgcagttgcg gatattctgc tgtggaagaa caggaaacta tctgcggggg tccttgctgg 1500  
 ggcaacattg atatggttcc tgttcgatgt agtagaatac aatataattc cgctcctttg 1560  
 ccagattgcc attcttgcca tgcttgatgt cttcatttgg tcaaatgccg caccactctt 1620  
 ggacaggtat tagctttatt tccttgagg atggtagaaa actcagctta cagaaatggc 1680  
 atttcacgta gtataacgca agacattagg tactaaaact caactaactg tttccgaatt 1740  
 tcaggggccc tccaaggatc ccagaaatca tcctctctga acatgccttc agagaaatgg 1800  
 cattgaccgt ccattacaaa ctaacgtaca ctgtatctgt tctttacgac attgcatgtg 1860

gaaaggatct gaagagattt ctcttggtac ataataatct actcctttgc tacgttaata 1920  
agagatgtaa aaacatgcaa cagttccagt gccaacattg tccaaggatt gtgcaattct 1980  
ttctggagcg ctaaaattga ccagattaga cgcatcagaa tattgaattg cagagttagc 2040  
caataatcct cataatgtta atgtgctatt gttgttact actcaatata gttctggact 2100  
aacaatcaga ttgtttatga tattaagggtg gttggatctc tattggtatt gtcggcgatt 2160  
ggaagtcttt gcagcttgac aagtctacta tatattggta ggtattccag ataaatatta 2220  
aattttaata aaacaatcac acagaaggat ctgcggccgc tagcctaggc ccggg 2275

<210> 5

<211> 7492

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Plasmid pTS346

<400> 5

aattcaagct tgacgtcagg tggcactttt cggggaaatg tgcgcggaac ccctatttgt 60  
ttatttttct aaatacattc aaatatgtat ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg 120  
cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac atttccgtgt cgcccttatt 180  
cccttttttg cggcattttg ccttcctgtt tttgctcacc cagaaacgct ggtgaaagta 240  
aaagatgctg aagatcagtt ggggtgcacga gtgggttaca tcgaactgga tctcaacagc 300  
ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc caatgatgag cactttttaa 360  
gttctgctat gtggcgcggt attatcccgt attgacgccg ggcaagagca actcggctgc 420  
cgcatacact attctcagaa tgacttggtt gagtactcac cagtcacaga aaagcatctt 480  
acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca taaccatgag tgataacact 540  
ggggccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg agctaaccgc ttttttgac 600  
aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaac cggagctgaa tgaagccata 660

ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg caacaacgtt gcgcaaacta 720  
ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat taatagactg gatggaggcg 780  
gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg ctggctgggt tattgctgat 840  
aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg cagcactggg gccagatggt 900  
aagccctccc gtatcgtagt taictacacg acggggagtc aggcaactat ggatgaacga 960  
aatagacaga tcgtgagat aggtgcctca ctgattaagc attggttaact gtcagaccaa 1020  
gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt ttttaattta aaggatctag 1080  
gtgaagatcc tttttggctc gagtctcatg accaaaatcc cttaacgtga gttttcgttc 1140  
cactgagcgt cagaccccggt agaaaagatc aaaggatctt cttagatcc ttttttctg 1200  
cgcgtaatct gctgcttgca aacaaaaaaa ccaccgtac cagcgggtgt ttgtttgccg 1260  
gatcaagagc taccaactct ttttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca 1320  
aatactgtcc ttctagtgtg gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg 1380  
cctacatacc tcgtctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg 1440  
tgtcttaccg ggttggaactc aagacgatag ttaccggata aggcgacgag gtcgggctga 1500  
acgggggggt cgtgcacaca gccagcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac 1560  
ctacagcgtg agcattgaga aagcgccacg cttcccgaag ggagaaaggc ggacaggtat 1620  
ccgtaagcg gcagggtcgg aacaggagag cgacagagg agcttccagg gggaaacgcc 1680  
tggtatcttt atagtcctgt cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga 1740  
tgctcgtcag gggggcggag cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt tttacggttc 1800  
ctggcctttt gctggccttt tgctcacatg ttctttcctg cgttatcccc tgattctgtg 1860  
gataaccgta ttaccgcctt tgagttagct gataccgtc gccgcagccg aacgaccgag 1920  
cgcagcgagt cagttagcga ggaagcggaa gagcgcccaa tacgcaaacc gcctctcccc 1980  
gcgcgttggc ctgatcagaa ttcatatgca cgtgttcccg atctagtaac atagatgaca 2040  
ccgcgcgca taatttatcc tagtttgcgc gctatatattt gttttctatc gcgtattaaa 2100  
tgtataattg cgggactcta atcataaaaa cccatctcat aaataacgtc atgcattaca 2160  
tgtaattat tacatgctta acgtaattca acagaaatta tatgataatc atcgcaagac 2220  
cggcaacagg attcaatctt aagaaacttt attgccaaat gtttgaaacga tctgcttcgg 2280  
aggttacctt atctgatttt tgtaaaggtc tgataatggt ccgttgtttt gtaaatacagc 2340  
cagtcgcttg agtaaagaat ccggtctgaa tttctgaagc ctgatgtata gttaatatcc 2400

gcttcacgcc atgttcgtcc gcttttggcc gggagtgtgc cttccctgtt tgagaagatg 2460  
tctccgccga tgcttttccc cggagcgcacg tctgcaaggt tcccttttga tgccaccag 2520  
ccgagggcctt gtgcttctga ttttgtaatg taattatcag gtagcttatg atatgtctga 2580  
agataatccg caaccccgtc aaacgtgttg ataaccggtc ccatcgcgac ggcttgatgg 2640  
atctcttgct ggacaccggg atgctaggat gggttatcgt ggccggcgtg cgtgtgtggc 2700  
ttttgtaggc gccggcgacg gcgggggcaa tgtggcaggt gagtacaggt gcaagcgtgc 2760  
gcaagtgact gcaacaacca aggacggtca tggcgaaagc acctcacgag tccaccgtct 2820  
acaggatgta gcagtagcac ggtgaaagaa gtgttgtccc gtccattagg tgcattctca 2880  
ccgttggcca gaacaggacc gticaacagt taggttgagt gtaggacttt tacgtgggta 2940  
atgtatggca aatagtagta aattttggcc ccatttgtct ggctgacaat tcatatgcac 3000  
gtgttcccga tctagtaaca tagatgacac cgcgcgcgat aatttatect agtttgcgcg 3060  
ctatatattg ttttctatcg cgtattaaat gtataattgc gggactctaa tcataaaaac 3120  
ccatctcata aataacgtca tgcattacat gtaattatt acatgcttaa cgtaattcaa 3180  
cagaaattat atgataatca tcgcaagacc ggcaacagga ttcaatctta agaaacttta 3240  
ttgccaatg tttgaacgat ctgcttcgga gggttaccta agaaagtatg atggtgatgt 3300  
cgcagccttc cgctttcgct tcacggaaaa cctgaagcac actctcggcg ccattttcag 3360  
tcagctgctt gctttgttca aactgcctcc attccaaaac gagcgggtac tccaccatc 3420  
cggtcagaca atcccataaa gcgtccaggt tttcacgta gtattccgga agggcaagct 3480  
cctttttcaa tgtctggtgg aggtcgtga tacttctgat ttgttccccg ttaatgactg 3540  
cttttttcat cgcgacggct tgatggatct cttgctggac accgggatgc taggatgggt 3600  
tategtggcc ggcgtgcgtg tgtggctttt gtaggcgccg gcgacggcgg gggcaatgtg 3660  
gcaggtgagt cacgggtgcaa gcgtgcgcaa gtgactgcaa caaccaagga cggtcatggc 3720  
gaaagcacct cacgcgtcca ccgtctacag gatgtagcag tagcacgggtg aaagaagtgt 3780  
tgtcccgtcc attaggtgca ttctcaccgt tggccagaac aggaccgttc aacagttagg 3840  
ttgagtgtag gacttttacg tggttaatgt atggcaaata gtagtaaatt ttgccccat 3900  
tggctctggct gagatagaac atattctgga aagcctctag catatctttt ttgacagcta 3960  
aaccttgctt cttgccttct tggcttagca atgacgttgc ccatgtcgtg gcaaacatct 4020  
ggtaaggtaa ctgtattcgt ttgttccctt caacggctca atccccacag gccaaagctat 4080  
cctttccttg gcagtatagg ctcttgaga gattatacta ccatttttaa gtgcttataa 4140

agacgatgct ctctaaccag atcgatcaga aacacaaagt tttagcagcg taatatccca 4200  
cacacataca cacacgaagc tatgcctcct cattttccga gagattctga cagtgaccag 4260  
aatgtcagaa tgccatttca tgggcacaag tcgatccaca agcttcttgg tggaggtaaa 4320  
ggtgtgctat tattattcgc tttctaggaa attattcaga attagtgcct tttatcataa 4380  
cttctctctg agccgatgtg gttttggatt tcattgttgg gagctatgca gttgcggata 4440  
ttctgctgtg gaagaacagg aacttatctg cgggggtcct tgctggggca acattgatat 4500  
ggttcctgtt cgatgtagta gaatacaata taattccgct cctttgccag attgccattc 4560  
ttgccatgct tgtgatcttc atttggtaaa atgccgcacc actcttggac aggtattagc 4620  
tttatttcct gtggagatgg tagaaaactc agcttacaga aatggcattt cacgtagtat 4680  
aacgcaagac attaggtact aaaactcaac taactgttcc cgaatttcag ggcccccca 4740  
aggatcccag aatcatcat ctctgaacat gccttcagag aatggcattt gaccgtccat 4800  
tacaactaa cgtacactgt atctgttctt tacgacattg catgtggaaa ggatctgaag 4860  
agatttctcc tggtagataa taatctactc ctttgcctac ttaataagag atgtaaaaac 4920  
atgcaacagt tccagtcca acattgtcca aggattgtgc aattcttctt ggagcgctaa 4980  
aattgaccag attagacgca tcagaatatt gaattgcaga gttagccaat aatcctcata 5040  
atgttaatgt gctattgttg ttactactc aatatagttc tggactaaca atcagattgt 5100  
ttatgatatt aagggtggtg gatctctatt ggtattgtcg gcgattggaa gttcttgcag 5160  
cttgacaagt ctactatata ttggtaggta ttccagataa atattaaatt ttaataaaac 5220  
aatcacacag aaggatctgc ggccgctagc ctaggcccg gcgctagcct aggcccgggc 5280  
ccacaaaaat ctgagcttaa cagcacagtt gctcctctca gagcagaatc gggatttcaa 5340  
caccctcata tcaactacta cgttgtgtat aacgggtccac atgccggtat atacgatgac 5400  
tgggggtgta caaaggcggc aacaaacggc gttcccgag ttgcacacaa gaaatttgcc 5460  
actattacag aggcaagagc agcagctgac gcgtacacaa caagtcagca aacagacagg 5520  
ttgaacttca tccccaaagg agaagctcaa ctcaagccca agagcttgc taaggcccta 5580  
acaagcccac caaagcaaaa agcccactgg ctacgctag gaacaaaaag gccagcagt 5640  
gatccagccc caaaagagat ctcttttgc cggagatta caatggacga tttctctat 5700  
ctttacgatc taggaaggaa gttcgaagg gaaggtgacg acactatgtt caccactgat 5760  
aatgagaagg ttagcctctt caatttcaga aagaatgctg acccacagat ggtagagag 5820  
gcctacgcag caggtctcat caagacgatc taccgagta acaatctcca ggagatcaaa 5880

taccttccca agaaggttaa agatgcagtc aaaagattca ggactaattg catcaagaac 5940  
acagagaaag acatatttct caagatcaga agtactattc cagtatggac gattcaaggc 6000  
ttgcttcata aaccaaggca agtaatagag attggagtct ctaaaaaggt agttcctact 6060  
gaatctaagg ccatgcatgg agtctaagat tcaaatcgag gatctaacag aactcgccgt 6120  
gaagactggc gaacagttca tacagagtct tttacgactc aatgacaaga agaaaatctt 6180  
cgtcaacatg gtggagcacg acactctggt ctactccaaa aatgtcaaag atacagtctc 6240  
agaagaccaa agggctattg agacttttca acaaaggata atttcgggaa acctcctcgg 6300  
attccattgc ccagctatct gtcacttcat cgaaaggaca gtagaaaagg aagggtggctc 6360  
ctacaaatgc catcattgcg ataaaggaaa ggctatcatt caagatgcct ctgccgacag 6420  
tggtcccaaa gatggacccc caccacgag gagcatcgtg gaaaaagaag acgttccaac 6480  
cacgtcttca aagcaagtgg attgatgtga catctccact gacgtaaggg atgacgcaca 6540  
atcccactat ccttcgcaag acccttcctc tatataagga agttcatttc atttgagag 6600  
gacacgctga aatcaccagt ctctctctat aaatctatct ctctctctat aacctggac 6660  
ccagaacgac gcccggccga catccgccgt gccaccgagg cggacatgcc ggcggtctgc 6720  
accatcgtca accactacat cgagacaagc acggtcaact tccgtaccga gccgcaggaa 6780  
ccgcaggagt ggacggacga cctcgtccgt ctgcgggagc gctatccctg gctcgtcgcc 6840  
gaggtggacg gcgaggtcgc cgcatcgcc tacgcgggccc cctggaaggc acgcaacgcc 6900  
tacgactgga cgcccgagtc gaccgtgtac gtctccccc gccaccagcg gacgggactg 6960  
ggctccacgc tctacacca cctgctgaag tccctggagg cacagggtt caagagcgtg 7020  
gtcgtgtca tcgggctgcc caacgacccg agcgtgcgca tgcacgagge gctcgatat 7080  
gcccccgcg gcatgctgcg ggcgccggc ttcaagcacg ggaactggca tgacgtgggt 7140  
ttctggcagc tggacttcag cctgccgta ccgccccgtc cggtcctgcc cgtcaccgag 7200  
atctgagatc acgcgttcta ggatcccccg atgagctaag ctagctatat catcaattta 7260  
tgtattacac ataatatcgc actcagtctt tcacttacgg caatgtacca gctgatataa 7320  
tcagttattg aaatatttct gaatttaaac ttgcatcaat aaatttatgt ttttgcttgg 7380  
actataatac ctgacttggt attttatcaa taaatattta aactatattt ctttcaagat 7440  
gggaattaac atctacaaat tgccttttct tatcgacat gtacgtatcg cg 7492



<210> 6

<211> 1695

<212> DNA

<213> *Oryza sativa*

<220>

<223> E1 promoter

<400> 6

```
ccgcagatcc ttcigtgtga ttgttttatt aaaatttaaat atttatctgg aatacctacc 60
aatatatagt agacttgta agctgcaaga acttccaatc gccgacaata ccaatagaga 120
tccaaccacc ttaatatcat aaacaatctg attgttagtc cagaactata ttgagtagtg 180
aacaacaata gcacattaac attatgagga ttattggcta actctgcaat tcaatattct 240
gatgcgtcta atctggtaaa ttttagcgct ccagaaagaa ttgcacaatc cttggacaat 300
gttggcactg gaactgttgc atgtttttac atctcttatt aacgtagcaa aggagtagat 360
tattatgtac caggagaaat ctcttcagat cctttccaca tgcaatgtcg taaagaacag 420
atacagtgtg cgtagtttg taatggacgg tcaatgccat ttctctgaag gcatgttcag 480
agatgatgat ttctgggatc cttggagggg ccctgaaatt cggaacagat tagttgagtt 540
ttagtaccta atgtcttgcg ttatactacg tgaaatgcc a tttctgtaag ctgagttttc 600
taccatctcc acaggaaata aagctaatac ctgtccaaga gtggtgcggc atttgaccaa 660
atgaagatca caagcatggc aagaatggca atctggcaaa ggagcggaat tatattgtat 720
tctactacat cgaacaggaa ccatatcaat gttgcccag caaggacccc cgcagataag 780
ttctgttct tccacagcag aatatccgca actgcatagc tccaacaat gaaatccaaa 840
accacatcgg ctgagagaga agttatgata aaaggcacta attctgaata atttcctaga 900
aagcgaataa taatgcaca ccttgacctc caccaagaag cttgtggatc gacttgtgcc 960
catgaaatgg cattctgaca ttctggtaac tgtcagaatc tctcgaaaa tgaggaggca 1020
tagcttcgtg tgtgtatgtg tgtgggatat tacgctgcta aaactttgtg tttctgatcg 1080
atctggtag agagcatcgt ctttataagc acttaaaaaat ggtagtataa tctctcaagg 1140
agcctatact gccaaggaaa ggatagcttg gcctgtgggg attgagccgt tgaagggaac 1200
```

aaacgaatac agttacctta ccagatgttt gccacgacat gggcaacgtc attgctagac 1260  
caagaaggca agaagcaaag tttagctgtc aaaaaagata tgctagaggc tttccagaat 1320  
atgtttctatc tcagccagac caatgggggc aaaatttact actatttgcc atacattaac 1380  
cacgtaaaag tcctacactc aacctaaactg ttgaacggtc ctgttctggc caacggtgag 1440  
aatgcaccta atggacggga caacacttct ttcaccgtgc tactgctaca tcctgtagac 1500  
ggtggacgcg tgagggtgctt tcgcatgac cgtccttggg tgttgacgtc acttgcgac 1560  
gcttgaccg tgactcacct gccacattgc ccccgccgtc gccggcgctt aaaaagcca 1620  
cacacgcacg ccggccacga taacctatcc tagcatcccg gtgtccagca agagatccat 1680  
caagccgtcg cgatg 1695

<210> 7

<211> 365

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> deleted E1 promoter

<400> 7

tcagccagac caatgggggc aaaatttact actatttgcc atacattaac cacgtaaaag 60  
tcctacactc aacctaaactg ttgaacggtc ctgttctggc caacggtgag aatgcaccta 120  
atggacggga caacacttct ttcaccgtgc tactgctaca tcctgtagac ggtggacgcg 180  
tgagggtgctt tcgcatgac cgtccttggg tgttgacgtc acttgcgac gcttgaccg 240  
tgactcacct gccacattgc ccccgccgtc gccggcgctt aaaaagcca cacacgcacg 300  
ccggccacga taacctatcc tagcatcccg gtgtccagca agagatccat caagccgtcg 360  
cgatg 365

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06222

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A01H5/00, C12N15/11, C12N15/63, C12N15/82

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A01H5/00, C12N15/11, C12N15/63, C12N15/82

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG), JICST FILE (JOIS),  
DDBJ, GenBank, EMBL, GeneSeq, JPOna

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO, 89/10396, A1 (PLANT GENETIC SYSTEMS N.V.), 02 November, 1989 (02.11.89), Full text; all drawings & JP, 2-503988, A & US, 5652354, A	6, 8
A	WO, 92/13956, A1 (PLANT GENETIC SYSTEMS N.V.), 20 August, 1992 (20.08.92), Full text; all drawings & JP, 6-504910, A & US, 5639948, A	6, 8

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to
"A" document defining the general state of the art which is not	understand the principle or theory underlying the invention
considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
"E" earlier document but published on or after the international filing	considered novel or cannot be considered to involve an inventive
date	step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
cited to establish the publication date of another citation or other	considered to involve an inventive step when the document is
special reason (as specified)	combined with one or more other such documents, such
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other	combination being obvious to a person skilled in the art
means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later	
than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 05 December, 2000 (05.12.00)	Date of mailing of the international search report 12 December, 2000 (12.12.00)
-------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06222

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: 1-5,7,9,10  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
  
The promoters to be employed are not sufficiently specified. In particular, it is completely unclear, based on the term "a fragment of the first promoter", as far as which part can act as a promoter and enables the construction of male sterile plant.
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP00/06222

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A01H5/00, C12N15/11, C12N15/63, C12N15/82

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A01H5/00, C12N15/11, C12N15/63, C12N15/82

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS (DIALOG), JICSTファイル (JOIS),  
DDBJ, GenBank, EMBL, GeneSeq, JPOna

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO, 89/10396, A1 (PLANT GENETIC SYSTEMS N.V.), 2. 11月. 1989 (02. 11. 89), 全文, 全図&JP, 2-503988, A&US, 5652354, A	6, 8
A	WO, 92/13956, A1 (PLANT GENETIC SYSTEMS N.V.), 20. 8月. 1992 (20. 08. 92), 全文, 全図&JP, 6-504910, A&US, 5639948, A	6, 8

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

05. 12. 00

国際調査報告の発送日

12.12.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

坂田 誠

2B

9318

電話番号 03-3581-1101 内線 3235

## 第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☒ 請求の範囲 1-5, 7, 9, 10 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、  
使用するプロモーターの特定が不十分である。特に「第一のプロモーターの断片」という記載では、どの部分までがプロモーターとしての機能を有し、雄性不稔植物を作出することができるのか、まったく不明瞭である。
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。